

## 明 細 書

## 安定保存可能な酸素輸液剤

本明細書において引用される種々の文献は、ここでの引用により、その全体が本明細書の一部をなすものとして援用される。

## 技術分野

本発明は、酸素輸液剤を長期保存する方法、長期保存に適した酸素輸液剤、および該酸素輸液剤の製造方法に関する。

本発明の酸素輸液剤は医学および薬学での広い応用が可能であり、また輸血用血液と同様、そのまま或いは必要に応じ添加物を加えた状態で、赤血球代替物として臨床治療に利用される。

## 背景技術

人血を血管内に注入する現行の輸血システムは、血液型不適合；感染（肝炎、エイズウイルスなど）の可能性；赤血球の保存期限が短い（約3週間）等、種々の問題に直面している。従って、これらの問題を解決できる代替物に対する要求が大きく、その一つとして、電解質輸液、膠質輸液等の輸液製剤が従来広く使用されてきた。

しかし、これらの輸液製剤は血液の最も重要な機能、即ち酸素を運搬する赤血球機能の代替機能を有してないため、この酸素運搬機能をも代替できる酸素輸液剤（人工赤血球）の

開発が極めて重要になっている。このような酸素輸液剤として、酸素溶解能の高いパーフルオロカーボン誘導体の水性懸濁液、並びに可逆的な酸素結合能を有するヘモグロビン（ヒトヘモグロビン、ウシヘモグロビン、および組換えヘモグロビン）、分子内架橋ヘモグロビン、水溶性高分子結合ヘモグロビン、分子間架橋重合ヘモグロビンなどを用いた酸素輸液剤の臨床試験が開発され、臨床試験が進行している。しかし、その非細胞型構造に起因する各種の副作用が明らかにされている。

ヘモグロビン（Hb）が本来赤血球膜に包まれている理由として、下記の事項が考えられる：

- 1) 12～15 g/dl 濃度の濃厚 Hb 溶液による高い粘度および膠質浸透圧の影響を抑制すること；
- 2) 生理活性の高いヘモグロビンを膜内に封じ込めることにより、その逸脱を抑制すること；
- 3) Hb 機能を維持するための各種リン酸、解糖・還元酵素系を同一系内に保持すること；および
- 4) 血球分散系は非ニュートン性流体であり、体内（特に末梢血管）循環において特色ある流動形式により生理作用を示す利点があること。

上記のような赤血球構造の本来の役割を考慮すれば、酸素輸液剤としては、ヘモグロビンをカプセル封入した粒子の分散系が適切であることは明らかである。一方、生体成分であるリン脂質が単独で小胞構造を形成することが発見され、Djordjeovich と Miller がリン脂質／コレステロール／脂肪酸

から成るリポソームを利用したヘモグロビン小胞体の検討を開始して以来、多くの機関でヘモグロビン小胞体の研究が進められてきた。ヘモグロビン小胞体の使用には、1) 天然のヘモグロビンがそのまま使えること、2) ヘモグロビン由来の副作用を抑制できること、3) 粘度や膠質浸透圧、酸素親和度を任意の値に調節できること、4) 体内血中滞留時間を延長できること等の利点がある。

ヘモグロビンの酸素結合部位であるヘム (プロトポルフィリン IX) は、グロビンから逸脱すると同時に酸素結合能を失うことは当業者には周知であり、グロビン鎖の構築する立体枠組みの役割と疎水場の重要性は良く認識されていた。そこで、グロビンの機能を代替できる系の開発に力が注がれてきた。本発明者らは、各種ポルフィリン誘導体について検討した結果、水相系で可逆的に酸素を結合する能力を有するリピドヘム (ヘム結合脂質) : 5,10,15,20-tetrakis[ $\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -o-{2',2'-dimethyl-20'(2"-trimethylammonioethyl)phosphonatoxyeicosanamido}-phenyl]porphyrinato iron(II)およびその他の合成に成功した。このリピドヘムをリン脂質と混合して水相に分散処理することにより構成されるリピドヘム小胞体では、リピドヘムがリン脂質膜疎水場に包埋され分散配向している。水相分散系にある粒径の揃ったリピドヘム小胞体では、生理条件下にある赤血球内ヘモグロビンと同様に、可逆的な酸素配位が可能となることが観測されている。かくして、血液と同じヘム濃度の赤い色をしたこの水相系は、全合成による酸素輸液剤として誕生した (E.Hasegawa, et. al., Biochem.

Biopjys. Res. Commun. vol.105, 1416-1419, 1982)。動物投与試験も詳細になされ、出血ショックモデル犬の蘇生試験では、ヘム濃度に応じた酸素運搬力が確認された。栄養油剤（精製大豆油、トリグリセリド）の油滴小球の周りをリピドヘムで覆ったリピドヘム-トリグリセリド小球体の酸素輸送能も確認されている。また、ヘム誘導体である 2-[8-{N-(2-methylimidazolyl)} octanoyloxymethyl]-5,10,15,20-tetrakis( $\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -o-pivalamido)phenyl-porphyrinato iron(II)等、ヒト血清アルブミンまたは組換えヒトアルブミンの疎水ポケットに吸着させた酸素輸液剤（アルブミン-ヘムと称する）が合成され、その酸素運搬能が確認されている（E.Tsuchida, et al., Bioconjugate Chemistry, vol.8, 534-538, 1997）。

このような酸素輸液剤の現状において、一つの大きな問題は、酸素輸液剤保存である。

酸素輸液剤の従来の保存方法には凍結保存、凍結乾燥粉末としての保存がある。しかし、凍結体はこれを融解する手間がかかり、また凍結乾燥粉末を溶解させる際には溶解までに時間を必要とする上に、気泡が発生してこれを除去する必要があるなどの煩雑さを伴う等の問題点が指摘されている。従って、凍結保存、凍結乾燥粉末保存は好ましくない。

加えて、酸素輸液剤はヘムタンパク質に特有の性質として経時的に劣化するので、安定に保存することが困難である。即ち、ヘモグロビン、リピドヘム、およびヘム誘導体は、そのヘムの中心元素である鉄が二価鉄 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) のときには酸素を可逆的に結合するのに対して、酸化型の三価鉄 ( $\text{Fe}^{3+}$ )

であるときは酸素結合能がない。また酸素を結合した二価鉄錯体でも、スーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) を遊離して次第に自動酸化し、三価鉄 (メト体) となって酸素結合能を失う。更に、メト体からはヘムおよび鉄イオンが遊離し易くなるので、生体への悪影響が懸念される。

この酸化反応を抑制する方法としては、記述したように単に冷蔵保存して反応速度を低下させることも可能であるが、次第に三価鉄が増大する。そこで、赤血球に本来存在しているメトヘモグロビン還元酵素系や、カタラーゼおよびスーパーオキシドディスムターゼなどの活性酸素を消去する酵素を添加する方法が知られている。また、ヘモグロビンおよびヘム誘導体に対して酸素の200倍の親和度を示す一酸化炭素 (CO) を結合させて、二価鉄の状態を保ち、極めて長期間に亘って三価鉄への酸化を抑制することもできる。

しかし、メトヘモグロビン還元酵素系や活性酸素消去酵素を添加する方法では、長期保存中に酵素活性が低下する。また、一酸化炭素雰囲気下で冷蔵保存した酸素輸液は、大量の一酸化炭素が有害であり、また結合した一酸化炭素を除去しない限り酸素結合能が無いので、このままでの投与はできない。しかも、オキシ型に変換した後の冷蔵保存では、三価鉄状態への酸化が次第に進行し、酸素運搬能が低下する。二価鉄状態のヘモグロビンの酸素分圧と酸化速度の相関は良く知られており、デオキシヘモグロビンでは酸化反応が進行しないことは実験的に確認されている (Sakai et al., Bull. Chem. Soc. Jpn., 1994, 1120-1125; Takeoka et al., Bioconjugate Chem.,

vol.8, 539-544, 1997)。

また、ヘモグロビンおよびヘム誘導体の酸化反応が抑制されたとしても、酸素輸液剤の保存にはもう一つ別の課題がある。即ち、ヘモグロビン小胞体、リピドヘム小胞体、リピドヘム-トリグリセリド小球体のように、ヘムの周囲環境を形成している脂質分子集合体構造は、共有結合を介さずに成分分子間の相互作用力（疎水性相互作用、静電的相互作用、水素結合など）から構成されているため不安定な場合が多く、生理塩水に分散させて冷蔵保存すると、次第に凝集体を形成し、融合して粒径が変化するので、何らかの構造安定化が望まれていた。そのような方法として、次のような安定化技術が知られている。

ヘモグロビン小胞体やリピドヘム小胞体において、重合性のリン脂質を小胞体の構成成分とし、 $\gamma$ 線や紫外線照射によってこれを重合することにより小胞体構造を極めて安定にすることができる。この場合、分散液を液体窒素で急速冷凍して長期保存が可能となる。凍結融解を10回繰り返してもヘモグロビンの漏出はなく、また粒径も変化せず、酸素結合解離曲線にも変動が無い（Sato et al., ASAIO Journal, vol.38, M580-M584, 1992）。また、この系にマルトースやスクロースなどの糖を添加し、凍結乾燥して得られる粉末は極めて安定である。例えばヘモグロビン小胞体の場合、20週間4℃で保存した後、純水を添加して再溶解させた後の物性解析では、メトヘモグロビン含量の増大は認められず、ヘモグロビンの漏出もなく、また小胞体の粒径が変化しておらず、凍結

乾燥前の状態とほぼ同等であることが確認されている

(Wang et al., Polymer Adv. Technol., vol.4, 8-11, 1992)。

ポリオキシエチレンを結合した脂質を、リン脂質小胞体の表面に導入する方法は良く知られている。しかし、その目的は、血中滞留時間を延長させて封入した抗癌剤を腫瘍組織に効率良く運搬することであり、既に臨床試験も最終段階となり、その安全性は十分に認められている。また、ヘモグロビン小胞体と血漿蛋白質との相互作用を抑制させることを目的として、ヘモグロビン小胞体の表面をポリオキシエチレンで修飾することにより、血流動態が改善されることも確認されている (Sakai et al., Bioconjugate Chemistry, vol.8, 23-30, 1997)。しかし、酸素輸液剤の保存に関して、このポリオキシエチレン修飾法を利用することは知られていなかった。

#### 発明の開示

本発明の目的は、酸素輸液剤の長期室温棚置き保存を可能にする技術手段を確立することである。

本発明の一つの側面によれば、水性媒質中に分散された脂質分子集合体と、該脂質分子集合体に含まれるヘムまたはヘム誘導体を含む水性分散液からなる酸素輸液剤の保存方法であって：

前記水性分散液から酸素を除去した、前記ヘムまたはヘム誘導体のデオキシ型にすることを特徴とする酸素輸液剤の保存方法によって達成される。

本発明のもう一つの側面によれば、アルブミン-ヘムを含

有する水溶液からなる酸素輸液剤の保存方法であって：

前記水溶液から酸素を除去して、前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にすることと；

この酸素を除去された水溶液を不活性ガス雰囲気中で保存することを特徴とする酸素輸液剤の保存方法が提供される。

本発明のもう一つ側面によれば、水性媒質中に分散された脂質分子集合体と、該脂質分子集合体に含まれるヘムまたはヘム誘導体を含有する酸素輸液剤であって：

前記脂質分子集合体の表面がポリオキシエチレンで修飾されていることと；

前記ヘムまたはヘム誘導体がデオキシ型であることと；

前記酸素輸液剤が、不活性ガスを充填した酸素不透過性の容器内に充填されていることを特徴とする長期保存性に優れた酸素輸液剤が提供される。

本発明の別の側面によれば、水性媒質中に分散された脂質分子集合体と、該脂質分子集合体に含まれるヘムまたはヘム誘導体を含有する水性分散液からなる酸素輸液剤の製造方法であって：

表面がポリオキシエチレンで修飾され、且つ前記ヘムまたはヘム誘導体を含んだ前記脂質分子集合体の水性分散液を調製する工程と；

該水性分散液から酸素を除去することにより、前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にする工程と；



前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にした水性分散液を酸素不透過性の容器に収容するとともに、該容器内に不活性ガスを充填する工程を具備したことを特徴とする長期保存性に優れた酸素輸液剤の製造方法が提供される。

本発明の更に別の側面によれば、アルブミン-ヘムを含有する水溶液からなる酸素輸液剤の製造方法であって：

アルブミン-ヘムを含有する水溶液を調製する工程と；

該水溶液から酸素を除去することにより、前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にする工程と；

前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にした水溶液を酸素不透過性の容器に収容するとともに、該容器内に不活性ガスを充填する工程を具備したことを特徴とする酸素輸液剤の製造方法が提供される。

#### 図面の簡単な説明

図1は、ポリオキシエチレン修飾デオキシ型ヘモグロビン小胞体の保存安定度を示したグラフである。

#### 発明を実施するための最良の形態

本明細書において引用される種々の文献は、ここでの引用により、その全体が本明細書の一部をなすものとして援用される。

本発明において。「脂質分子集合体」とは、脂質および／またはリポタンパク質によって、共有結合を介さずに、水性

媒質中における分子間の相互作用（疎水性相互作用、静電的相互作用、水素結合など）により構成された膜構造体と言う。典型的には小胞体（リポソーム）および小球体（マイクロソフィア）が挙げられるが、広義には赤血球膜等の細胞膜も含まれる。更に、ヘモグロビン小胞体、リピドヘム小胞体、リピドヘムトリグリセリド小球体もまた、脂質分子集合体からなる小胞体の典型例である。

本発明において、「ヘムまたはその誘導体」とは、ヘムだけでなく、ヘムのポルフィリン環が置換基により修飾されたヘム誘導体のうち、酸素との可逆的な結合能を有するもの全てを包含する。

本発明における「水性媒質」には、水および全ての生理学的に許容可能な全ての水溶液、例えば、電解質水溶液、緩衝液、タンパク質水溶液、脂質エマルジョン水溶液、血漿、血漿増量剤（デキストラン、ヒドロキシエチルスターチ、ゼラチン等のコロイド水溶液）およびこれらの組み合わせが含まれる。

本発明における不活性ガスとは、化学的に不活性なガスを意味し、例えばヘリウム、アルゴン、ネオンなどの希ガスに加えて、窒素が含まれる。経済的な理由からは窒素ガスが好ましい。

次に、本発明の構成を詳しく説明すれば次の通りである。

既報に従って調製したヘモグロビン小球体(Sakai et al., *Biotechnology Progress*, vol. 12, 119-125, 1996)、リピドヘム小胞体(E. Hasegawa et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,

vol. 105, 1416-1419, 1982)、リピドヘム-トリグリセリド小胞体(E. Tsuchida et al., *Biochimica Biophysica Acta*, vol. 1108(2), 253-256, 1992)、およびアルブミン-ヘム(E. Tsuchida et al., *Bioconjugate Chemistry*, vol. 8, 534-538, 1997)の生理塩水溶液について、ヘムが鉄二価の状態であることを確認した後、この分散液を所定の成分濃度(例えばヘモグロビン濃度 10g/dL、ヘム濃度 6.2mM)に調節し、分散液から酸素を除去する。除去方法としては、酸素を含まない窒素またはその他の不活性ガス(アルゴン、ヘリウムなど)に曝して、溶解している酸素を排気させる。この操作をすることによりオキシ型のヘムは酸素を結合していないデオキシ型ヘムに変換させる。このためには、上記酸素輸液剤を硝子瓶などの酸素を透過しない密封性の容器に封入後、容器内でこの気体の気泡を発生させて通気することで溶存酸素を排気する。

溶存酸素濃度は、クラーク式酸素電極を分散液に漬けて酸素分圧をモニターする方法、容器内の気相を採取してこれをガスクロマトグラフィーにて測定する方法、または容器内のヘモグロビンおよびヘムの特徴ある可視もしくは近赤外スペクトルの測定から、オキシ型とデオキシ型の比率を算出する方法により知ることもできる。このようにして得られたデオキシ型の各酸素輸液剤は、酸素を遮断して保存することにより、ヘモグロビンおよびヘムの酸化、また脂質などその他の成分の酸素酸化を抑制することができる。

酸素除去操作後に、溶液中に残存している微量の酸素を更に除去することを目的として、小胞体中、或いは溶液中に適

量のチオール類（ホモシステイン、アセチルシステイン、グルタチオンなど）、アスコルビン酸、亜ニチオン酸などのような酸素と反応する試薬を少量溶存させても良い。

上記のようにして得られたデオキシ型の各酸素輸液剤は、酸素を遮断して保存するために、例えば硝子瓶に直接封入したり、アルミニウム/ポリエチレン層状バッグ(aluminized polyethylene bag)や、ポリ塩化ビニリデン系、エチレンービニルアルコール共重合体系など、酸素透過性が極めて低い材質から成る容器に入れて封入したり、またはプラスチック製バッグに封入しこれを更に酸素を透過しない容器に入れる。保存温度は、 $-20^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$ の間で可能であるが、好ましくは $4 \sim 25^{\circ}\text{C}$ の冷暗所保存をする。以上の操作により、ヘモグロビンおよびヘムの酸化、また脂質などその他の成分の酸素酸化を抑制することができる。

上記の酸素除去に加えて、ヘモグロビン小胞体、リポドヘム小胞体、およびリポドヘムトリグリセリド小球体の場合は、粒子表面に保存安定度向上のためにポリオキシエチレンを予め結合させるのが好ましい。このためには、ポリオキシエチレンを結合した脂質（ポリオキシエチレン脂質）の分散液を $4 \sim 60^{\circ}\text{C}$ で添加する。本脂質の疎水性部分は粒子表面の脂質膜中に挿入され、親水性のポリオキシエチレン鎖が水相に伸びた状態で固定される（Sakai et al., Bioconjugate Chemistry, vol. 8, 23-30, 1997）。操作温度が高いほど導入速度が速いが、冷却して行っても良い。また小胞体の膜成分としてコレステロールを多く含むため、明確な相転移温度は無

いが、成分リン脂質の相転移温度以下でも十分に導入される。  
ポリオキシエチレン脂質のポリオキシエチレン鎖分子量は、  
1,000～20,000で良く、導入量は、粒子の外層に面している  
脂質総量に対して、0.01～3mol%、好ましくは0.05～

0.3mol%導入する。ポリオキシエチレン脂質の疎水性部分は  
エタノールアミン型リン脂質、コレステロール、アルキル鎖  
結合グルタミン酸、アルキル鎖結合リジンなどがある。ポリ  
オキシエチレンと脂質部分の結合様式は、エステル結合、ウ  
レタン結合、アミド結合、エーテル結合などがある。ポリオ  
キシエチレンを粒子表面に導入することで保存中の凝集と融  
合による粒径変化を抑え、またヘモグロビン小胞体の場合、  
ヘモグロビンをはじめとする内包物の漏出を防ぐことができ  
る。

上記の構成からなる本発明の作用は次の通りである。本発  
明は、酸素を除去することで酸素輸液剤中のヘモグロビンお  
よびヘム誘導体の酸化を抑制する。この酸化抑制の効果によ  
り、保存中のスーパーオキシサイドアニオンや過酸化水素の発  
生が防止され、従って、ヘムおよびヘム誘導体を担持する脂  
質分子集合体の酸化および変性が防止される。その結果、脂  
質分子集合体の物理的安定性が向上し、粒径変化および凝集  
体の形成が防止されるので、脂質分子集合体からなる酸素輸  
液剤の保存寿命が向上する。

加えて、分子集合体であるヘモグロビン小胞体、リピドヘ  
ム小胞体、およびリピドヘム-トリグリセリド小球体の表面  
にポリオキシエチレンを導入することにより、これら粒子の

脂質分子集合体を更に安定化させることができる。従って、保存中の粒子の凝集と融合による粒径変化や、ヘモグロビンをはじめとする内包物の漏出等を効果的に防止し、酸素輸液剤の保存安定性を更に向上させることができる。

本発明において留意すべきことは、ヘム鉄の二価から三価への酸化と脂質分子集合体構造の不安定性との間には、相互に他を助長する関係が存在することである。即ち、ヘム鉄の酸化に伴って発生したスーパーオキシドアニオン ( $O_2^{\cdot -}$ ) や過酸化水素、およびそれによって生じるフェリルヘモグロビンは、リン脂質等の脂質分子集合体の構成成分を酸化して、脂質分子集合体の崩壊を助長する。また、脂質分子集合体の崩壊は、ヘム鉄の存在環境を悪化させて酸化を助長する可能性がある。本発明はこの点に着目し、ヘムおよびヘム誘導体の酸化抑制と、ヘムおよびヘム誘導体のキャリアである脂質分子集合体の安定化とを同時に達成することにより、従来達成され得なかった酸素輸液剤の室温棚置き保存を可能とする。

なお、アルブミン-ヘム水溶液を用いた酸素輸液剤は溶液の状態で安定であるため、脂質分子集合体構造は採用されない。従って、脂質分子集合体構造の安定化という作用効果とは直接関係はないが、酸素を除去した状態で保存することによりヘムのメト化を防止し、保存性を顕著に向上できる点においては同様である。

得られる脱酸素型の酸素輸液剤は長期保存が可能となるので、医療機関の各部署、救急車、医療機関が無い遠隔地などに常備することにより、必要時に直ちに体内投与することが

可能になる。デオキシ型とした各酸素輸液剤は、空気に曝すと直ちに酸素を結合してオキシ型となる。また、デオキシ型のまま静脈内投与しても、先ず肺を通過するときに直ちに酸素と結合してオキシ型となり、末梢にて酸素を放出する。

次に実施例を挙げて本発明をより詳しく説明する。

#### 実施例 1

無菌的雰囲気において、ヒト赤血球から精製して得た高純度ストロマフリーヘモグロビン溶液(40g/dL)に、ピリドキサル 5'-リン酸を、ヘモグロビンに対して3倍モルとなるように添加した。また、ホモシステインを濃度5mMとなるように添加し、更に1M- $\text{Na}_2\text{CO}_3$ によりpHを7.4とした。

Remolino(Millipore社)を用いて孔径 $0.22\mu\text{m}$ のFMマイクロフィルター(富士フィルム)で濾過し、仕込みヘモグロビン溶液を得た。次いで、混合脂質粉末 Presone PPG-I(ホスファチジルコリン/コレステロール/ホスファチジルグリセロールの混合物)を脂質濃度が4.5wt%となるように少量ずつ添加し、 $4^\circ\text{C}$ で終夜攪拌して、ヘモグロビン内包多重層小胞体を得た。エクストルージョン法により、これら小胞体の粒径及び被覆総数の制御を行った。最終的に、FMマイクロフィルター(孔径 $0.22\mu\text{m}$ )を2回透過させた。得られたヘモグロビン小胞体溶液を生理食塩水で希釈し、超遠心分離( $50,000\text{g}$ , 40 min)後に上澄みヘモグロビン溶液を吸引除去し、ヘモグロビン小胞体を生理食塩水に再分散させた。

生理食塩水に溶解させたポリオキシエチレン結合脂質、  
N-(monomethoxypolyoxyethylene-

carbamyl)distearoylphosphatidyl-ethanolamine (ポリオキシエチレン鎖の分子量は 5300) を、小胞体外表面の脂質の 0.3mol%分に対応する量で滴下した。これを 25℃で 2 時間攪拌した後、4℃で終夜攪拌して、ヘモグロビン小胞体の表面をポリオキシエチレンで修飾した。

円筒型フラスコにヘモグロビン小胞体分散液 (0.5g/dL, 200mL) を入れ、これをロータリーエバポレータに装填して回転 (56 rpm) させた。これによって形成された液膜に、ハロゲンランプ (500W) を用いて酸素通気下 (1L/min) で 3 分間可視光を照射し、一酸化炭素結合ヘモグロビン (HbCO) からオキシヘモグロビン (HbO<sub>2</sub>) への配位子交換を行った。該分散液を超遠心分離 (50,000g, 60 min) してヘモグロビン小胞体粒子を沈降させ、外水相生理食塩水を除去した後、分散媒としてリン酸緩衝生理食塩水を加えて再分散させた。ヘモグロビン濃度を 10g/dL とし、Dismic-25: 0.45  $\mu$ m フィルター (ADVANTEC) で濾過して、ポリオキシエチレン修飾ヘモグロビン小胞体を得た。

上記で得たポリオキシエチレン修飾ヘモグロビン小胞体分散液 30mL を、100mL 容量のバイアル瓶に入れて密封した。滅菌ディスクフィルターを通し更に水蒸気飽和させた窒素ガスを瓶内に導き、小胞体分散液中でバブリングさせて、溶解している酸素を除去した。系内の酸素分圧をクラーク型酸素電極 (酸素分圧測定装置, =Po<sub>2</sub>-100, Inter Medical) によってモニターしたところ、酸素分圧が 1 Torr まで低下した。この操作により、オキシヘモグロビンはオキシヘモグロビン



に変換されたと判断した。

こうして得られた本発明の酸素輸液剤について、保存試験を行った。保存条件としては冷蔵保存（4℃）、室温保存（23℃）、恒温槽保存（40℃）を設定し、それぞれの試料について1年後まで、以下の測定を行って保存前の試料と比較した。

①試料 30  $\mu$  L を生理食塩水で 100 倍に希釈し、室温において 1 mm セルを用いて 300～900nm まで紫外可視吸収スペクトル測定を行った。保存前の試料と比較して、新たな吸収極大の出現の有無や、Q 帯ピークの出現波長のずれについて検討した。

②試料の沈澱形成の有無を目視により確認した。また試料 30  $\mu$  L を生理食塩水で 10 倍に希釈し、室温において 1mm セルを用いて 900 nm の吸光度を測定した。生理食塩水の 900nm の吸光度をリファレンスとして差し引き、試料の濁度とした。

③試料約 0.2mL をりん酸緩衝生理食塩水（PBS）で 200 倍に希釈し、超遠心分離（100,000g, 15min）を行った後、上澄み液のヘモグロビン定量を行って溶血の有無を確認した。

④粒径分布は、25℃において、Sub-micron Particle Analyzr Model N4-SD (Coulter Corporate Communications) を用いて動的光散乱法により測定した。

⑤Hemox-Analyzer(TCS Medical Products Co.)を用いて酸素結合解離曲線を測定し、その解析から酸素親和度(P<sub>50</sub>)、酸素運搬効率(OTE)、Hill 係数を算出した。

⑥脂質の分解を検討するため、試料約 0.2mL を凍結乾燥させた後、 $\text{CHCl}_3$  により脂質を抽出し、展開溶媒としてクロロホルム/メタノール/28%アンモニア=13/7/1(容量比) および、クロロホルム/アセトン/メタノール/酢酸/水=10/4/2/2/1(容量比)を用いて二次元薄層クロマトグラフィー(シリカゲルプレート)を測定した。

⑦試料約 0.2mL を凍結乾燥させた後で、約 1mL の  $\text{CDCl}_3$  により膜成分を抽出し、フィルター濾過した後、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトル(JNM-LA500、日本電子)を測定した。また外水相に遊離したポリオキシエチレン鎖を除去するため、試料約 0.2 mL を PBS で約 200 倍に希釈し、超遠心分離(100,000g, 15min)を行って上澄み液を除去した。沈澱を PBS で再分散させた後で凍結乾燥させ、約 1 mL の  $\text{CDCl}_3$  により膜成分を抽出し、フィルター濾過をした後に、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを測定した。ポリオキシエチレン脂質のポリオキシエチレン鎖メチレン基プロトンのピーク (B) は、 $\delta$  :3.63ppm に、ホスファチジルコリンのコリンメチルプロトンのピーク (A) は  $\delta$  :3.39ppm に出現する。各々のプロトン数の比が積分比 B/A に等しいとして、ポリオキシエチレン鎖の導入率は次式に従って算出した。

$$(\text{水相除去後の積分比 B/A}) \div (\text{仕込みの積分比}) \times 100$$

図 1 に、保存中におけるヘモグロビン小胞体分散液の諸物性値の推移を示す。いずれの試料についても、1 年の保存期間中に、紫外可視吸収スペクトルにおけるメト体由来の

630nm の新たなピークの出現、Q 帯および Soret 帯の吸光度の変化、および波長のずれはいずれも確認されなかった。また溶血は認められず、二次元薄層クロマトグラフィーにおいて遊離の脂肪酸は観察されなかった。いずれの試料においても、保存 6 カ月後では、凝集による沈澱は観測されず、粒径や濁度も殆ど変化しなかった。また、40℃・6 カ月後のポリオキシエチレン鎖の導入率は、保存前と比較して 7% 程度の低下に留まった。P<sub>50</sub> の減少傾向は、40℃・6 カ月後でも保存前と比較して 5.5 Torr の減少に過ぎず、この程度の減少ではヘモグロビン小胞体の酸素運搬機能に問題は無いと判断された。しかし 40℃・1 年後では、脂質の分解と、P<sub>50</sub> が 43 Torr にまで増大する現象が観測された。保存後の初期メト化率はいずれの試料においても低下し、保存 1 カ月後までには 1 % 未満となる傾向が認められた。これはホモシステインにより酸化型メトヘモグロビンが還元されたためである。以上から、窒素雰囲気下ではポリオキシエチレン鎖で表面修飾したヘモグロビン小胞体は、40℃では 6 カ月間、23℃では 1 年間は棚置き保存が可能であることが判明した。

## 実施例 2

ポリオキシエチレン修飾をしていないヘモグロビン小胞体分散液を実施例 1 と同様に調製し、バイアル瓶に入れて密封し、滅菌ディスクフィルターを通した窒素をバブリングさせて通気し、溶解している酸素を完全に除去した。系内の酸素分圧を酸素分圧測定装置 (Po<sub>2</sub>-100, Inter Medicals 社) でモニターし、2 Torr にまで低下したことを確認した。この操作に

より、オキシヘモグロ빈はデオキシヘモグロ빈にほぼ変換された。

こうして得られた比較例酸素輸液剤について保存試験を行った。保存条件として冷蔵保存(4℃)、室温保存(23℃)、恒温槽内保存(40℃)を設定し、それぞれの試料について6カ月後まで以下の測定を行い、保存前の試料と比較した。試料の沈澱形成の有無を目視により確認した。また試料 30  $\mu$  L を生理食塩水で 10 倍に希釈し、室温において 1 mm セルを用いて 900nm の吸光度を測定した。生理食塩水の 900nm の吸光度をリファレンスとして差し引き、試料の濁度とした。粒径分布測定は、25℃において、Sub-micron Particle Analyzer Model N4 SD (Coulter Corporate Communications)を用いて動的散乱法により測定した。

メトヘモグロ빈含量の増大は全く認められず、保存 1 カ月後はほぼ一定に推移した。粒径の増大については、保存 1 週間後には 8% 程度増大して凝集による沈澱も若干観察されたが、未だ使用可能な状態であった。これに対して、酸素除去を行わなかった場合には、保存 1 週間後には最早使用不能な状態にまで沈澱を生じるから、酸素除去がヘモグロ빈小胞体の安定化にも寄与したことが分かる。

しかし、実施例 1 の結果との比較においては、いずれの試料も保存に伴って粒径が急激に増大している。この結果は、ヘモグロ빈小胞体の表面をポリオキシエチレンで修飾することと、無酸素の条件下で保存することとが相乗的に作用して、更に顕著な保存安定性が得られたことを示している。

### 実施例 3

実施例 1 と同様にして調製したポリオキシエチレン修飾ヘモグロビン小胞体分散液（ポリオキシエチレンの分子量は 2000）を実施例 1 記載の方法と同様に調製した。このデオキシ体を窒素雰囲気下でアルミニウムバッグ(Aluminized polyethylene bag, ジーエルサイエンス社製)の中に移して酸素を遮断し、冷蔵保存(4℃)、室温保存(23℃)、恒温槽内保存(40℃)を行った。それぞれの試料について 1 年後まで実施例 1 と同様の測定を行い、同様の結果を得た。

### 実施例 4

実施例 1 の調製法に記載のホモシステインをグルタチオンに換え、またポリオキシエチレン脂質のポリオキシエチレン鎖分子量を 10,000 とし、同様にしてポリオキシエチレン修飾ヘモグロビン小胞体分散液(50mL)を調製した。これを円筒型フラスコ(2L)に入れ、ロータリーエバポレータに装填して回転(60rpm)させることにより生じるヘモグロビン小胞体分散液の液膜に窒素を通気(1.0L/min)し、酸素を除去した。近赤外非侵襲酸素モニタ(OM-200 型、島津)によって、全ヘモグロビンの 98%以上がデオキシヘモグロビンであることを確認した。これを凍結保存用パック Cryocyte(Baxter)に密封し、更にこれをアルミ缶に封入して酸素の透過を遮断し、保存試験を行った。保存条件としては、冷蔵保存(4℃)、室温保存(23℃)、恒温槽内保存(40℃)を設定し、それぞれの試料について 1 年後まで実施例 1 と同様の測定を行い、同様の結果を得た。

### 実施例 5

リピドヘム小胞体分散液の調製には、5,10,15,20-tetrakis[ $\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -o-{2',2'-dimethyl-20'(2"-trimethylammonioethyl)phosphonatoxyeicosanamido}-phenyl]porphyrinato iron(II) (リピドヘム) / 1-stearylimidazole / dipalmitoyl phosphatidyl choline / cholesterol / polyoxyethylen-conjugated phospholipid (N-(monomethoxypolyoxyethylenecarbamyl)diphosphatidyl ethanolamine) を、モル比 1/3/40/20/2.5 で用いた。ポリオキシエチレン鎖の平均分子量は 5000 とした。これに生理食塩水を添加して、リピドヘム濃度を 5mM とした溶液を調製した。これを実施例 1 記載のエクストルージョン法により粒径の制御を行った後、アスコルビン酸を 6 mM 添加して硝子容器に封入した。実施例 1 と同じ方法で窒素を通気することにより、三価鉄のヘムは全て還元されて二価鉄のヘムとなり、また酸素分圧は 3 Torr にまで低下し、容器内はほぼデオキシ型のリピドヘム小胞体となった。これを室温にて 3 カ月保存した後の分析では、三価鉄ヘムの増大は認められなかった。また、粒子径は保存前の  $105 \pm 21 \text{ nm}$  に対して、保存後は  $107 \pm 28 \text{ nm}$  であり、殆ど変化は見られなかった。濁度の上昇は特に認められなかった。

### 実施例 6

リピドヘム-トリグリセリド小球体分散液の調製は、5,10,15,20-tetrakis[ $\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -o-{2',2'-dimethyl-20'(2"-trimethylammonioethyl)phosphonatoxyeicosanamido}-

phenyl]porphyrinato iron(II) (リポドヘム) / 1-stearylimidazole (モル比 1/2.5) に、大豆油 ([大豆油]/[ヘム]=2~4 重量比) を添加し、更に 2% グリセリン水溶液を加えた後、窒素雰囲気下において水浴下で超音波攪拌することにより行った。この分散液に、平均分子量 2000 のポリオキシエチレン結合脂質 (N-(monomethoxypolyoxyethylenecarbamyl)dipalmitoylphosphatidylethanolamine) を、リポドヘムに対して 0.02mol% 添加してポリオキシエチレン修飾した。分散液 180mL を 200mL の硝子容器に小過剰のアスコルビン酸と共に封入し、実施例 1 記載の方法と同様にして窒素バブルして酸素分圧を 2Torr にまで低下させ、デオキシ型のリポドヘム-トリグリセリド小球体を得た。これを室温にて 4 カ月間保存した後の分析では、鉄三価のヘムの増大は認められず、また粒子径は保存前の  $85 \pm 25\text{nm}$  に対して、保存後  $86 \pm 28\text{nm}$  であり、殆ど変化は見られなかった。

#### 実施例 7

アルブミン-ヘムの調製は、ヘム誘導体 (2-[8-{N-(2-methylimidazolyl)} octanoyloxymethyl]-5,10,15,20-tetrakis( $\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -o-pivalamido)phenylporphyrinato iron(II)) とヒト血清アルブミンをもとに、既報に従って行った (E. Tsuchida et al., Bioconjugate Chemistry, vol. 8, 534-538, 1997: この文献は、ここでの引用により本明細書の一部をなすものとして援用する)。ヘムが二価鉄の状態で酸素を結合していることを確認した後、アルブミン-ヘム溶液を硝子容

器に封入し、実施例 1 に記載の方法で窒素を通気することにより酸素分圧を 3Torr にまで低下させて、デオキシ型のアルブミンヘムを得た。これを 20℃にて 5 カ月間保存した後の分析では、三価鉄のヘムの増大は認められず、不溶物の増大は認められなかった。

#### 比較例 1

実施例 1 と同様にして調製したポリオキシエチレン修飾ヘモグロビン小胞体分散液の酸素分圧を、無菌的雰囲気下において、大気と同じ 149Torr とした。これをバイアル瓶に密封し、酸素除去を行うことなく、オキシヘモグロビンのままで恒温槽内保存(40℃)を行った。保存 1,4,24 時間後にメト化率を紫外可視吸収スペクトルから測定した。保存に伴ってメト化率は上昇し、保存前の 2.7%から保存 1 時間後には 5 %に、保存 4 時間後には 12 %に、保存 24 時間後には 36 %に増大した。

この結果は、ポリオキシエチレン修飾したヘモグロビン小胞体分散液でも、酸素を除去しない場合にはメトヘモグロビンの増大が著しく、本発明と同様の保存安定性が得られないことを示している。



## 請 求 の 範 囲

1. 水性媒質中に分散された脂質分子集合体と、該脂質分子集合体に含まれるヘムまたはヘム誘導体を含有する水性分散液からなる酸素輸液剤の保存方法であって：

前記水性分散液から酸素を除去し、前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にすることを特徴とする酸素輸液剤の保存方法。

2. 請求項1に記載の方法であって、更に、酸素を除去された後の前記水性分散液を不活性ガス雰囲気中で保存することを特徴とする酸素輸液剤の保存方法。

3. 請求項1に記載の方法であって、更に、前記脂質分子集合体表面をポリオキシエチレンで修飾することを特徴とする酸素輸液剤の保存方法。

4. 請求項1に記載の方法であって、前記脂質分子集合体が、ヘモグロビン小胞体、リピドヘム小胞体、およびリピドヘムトリグリセリド小球体からなる群から選択される酸素輸液剤の保存方法。

5. 請求項1に記載の方法であって、前記酸素の除去は、不活性ガスとのガス交換により行われることを特徴とする酸素輸液剤の保存方法。

6. アルブミン-ヘムを含有する水溶液からなる酸素輸液剤の保存方法であって：

前記水溶液から酸素を除去し、前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にすることを特徴とする酸素輸液剤の保存方法。

7. 請求項6に記載の方法であって、前記酸素の除去は、不活性ガスとのガス交換により行われることを特徴とする酸素輸液剤の保存方法。

8. 請求項6に記載の方法であって、更に、酸素を除去された後の前記水溶液を不活性ガス雰囲気中で保存することを特徴とする酸素輸液剤の保存方法。

9. 水性媒質中に分散された脂質分子集合体と、該脂質分子集合体に含まれるヘムまたはヘム誘導体を含有する酸素輸液剤であって：

前記脂質分子集合体表面がポリオキシエチレンで修飾されていることと；

前記ヘムまたはヘム誘導体がデオキシ型であることと；

前記酸素輸液剤が、不活性ガスを充填した酸素不透過性の容器内に收容されていることを特徴とする酸素輸液剤。

10. 請求項9に記載の酸素輸液剤であって、更に、生理学的に許容可能な還元剤を含有することを特徴とする酸素輸液剤。

11. アルブミン-ヘムを含有する水溶液からなる酸素輸液剤であって：

前記ヘムまたはヘム誘導体がデオキシ型であることと；

前記酸素輸液剤が、不活性ガスを充填した酸素不透過性の容器内に收容されていることとを特徴とする酸素輸液剤。

12. 請求項11に記載の酸素輸液剤であって、更に、生

理学的に許容可能な還元剤を含有することを特徴とする酸素輸液剤。

13. 水性媒質中に分散された脂質分子構造体と、該脂質分子集合体に含まれるヘムまたはヘム誘導体を含有する水性分散液からなる酸素輸液剤の製造方法であって：

表面がポリオキシエチレンで修飾され、且つ前記ヘムまたはヘム誘導体を含んだ前記脂質分子集合体の水性分散液を調製する工程と；

該水性分散液から酸素を除去することにより、前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にする工程と；

前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にした水性分散液を酸素不透過性の容器に収容するとともに、該容器内に不活性ガスを充填する工程を具備したことを特徴とする酸素輸液剤の製造方法。

14. 請求項13に記載の方法であって、前記酸素の除去は、不活性ガスとのガス交換により行われることを特徴とする酸素輸液剤の製造方法。

15. アルブミン-ヘムを含有する水溶液からなる酸素輸液剤の製造方法であって：

アルブミン-ヘムを含有する水溶液を調製する工程と；

該水溶液から酸素を除去することにより、前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にする工程と；

前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にした水溶液を酸素不透過性の容器に収容するとともに、該容器内に不活

性ガスを充填する工程を具備したことを特徴とする酸素輸液剤の製造方法。

16. 請求項15に記載の方法であって、前記酸素の除去は、不活性ガスとのガス交換により行われることを特徴とする酸素輸液剤の製造方法。

## 要 約 書

水性媒質中に分散された脂質分子集合体と、該脂質分子集合体に含まれるヘムまたはヘム誘導体とを含有する水性分散液からなる酸素輸液剤の保存方法であつて：前記水性分散液から酸素を除去して、前記ヘムまたはヘム誘導体をデオキシ型にすることと；この酸素を除去された水性分散液を不活性ガス雰囲気中で保存することとを特徴とする酸素輸液剤の保存方法。

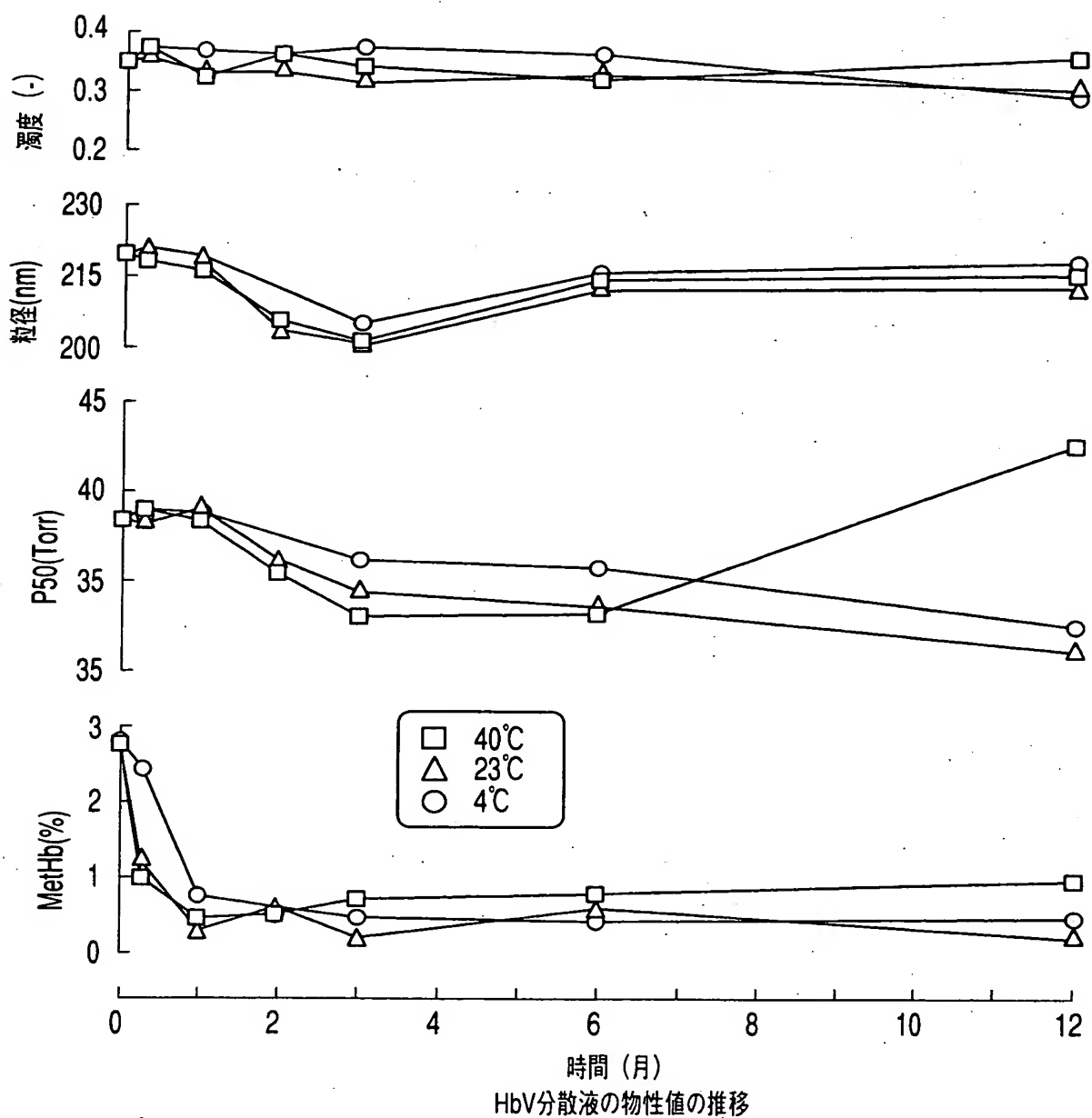


FIG. 1